

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年5月10日 (10.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/32220 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/22, 9/127, A61P 9/10, 3/10 (74) 代理人: 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07502
- (22) 国際出願日: 2000年10月26日 (26.10.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平 11/309984
1999年10月29日 (29.10.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メドジーンバイオサイエンス株式会社 (MEDGENE BIOSCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒560-0085 大阪府豊中市上新田1丁目24番C-1101号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森下竜一 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka (JP). 荻原俊男 (OGIHARA, Toshio) [JP/JP]; 〒562-0046 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE THERAPY FOR DIABETIC ISCHEMIC DISEASE

(54) 発明の名称: 糖尿病性虚血性疾患遺伝子治療

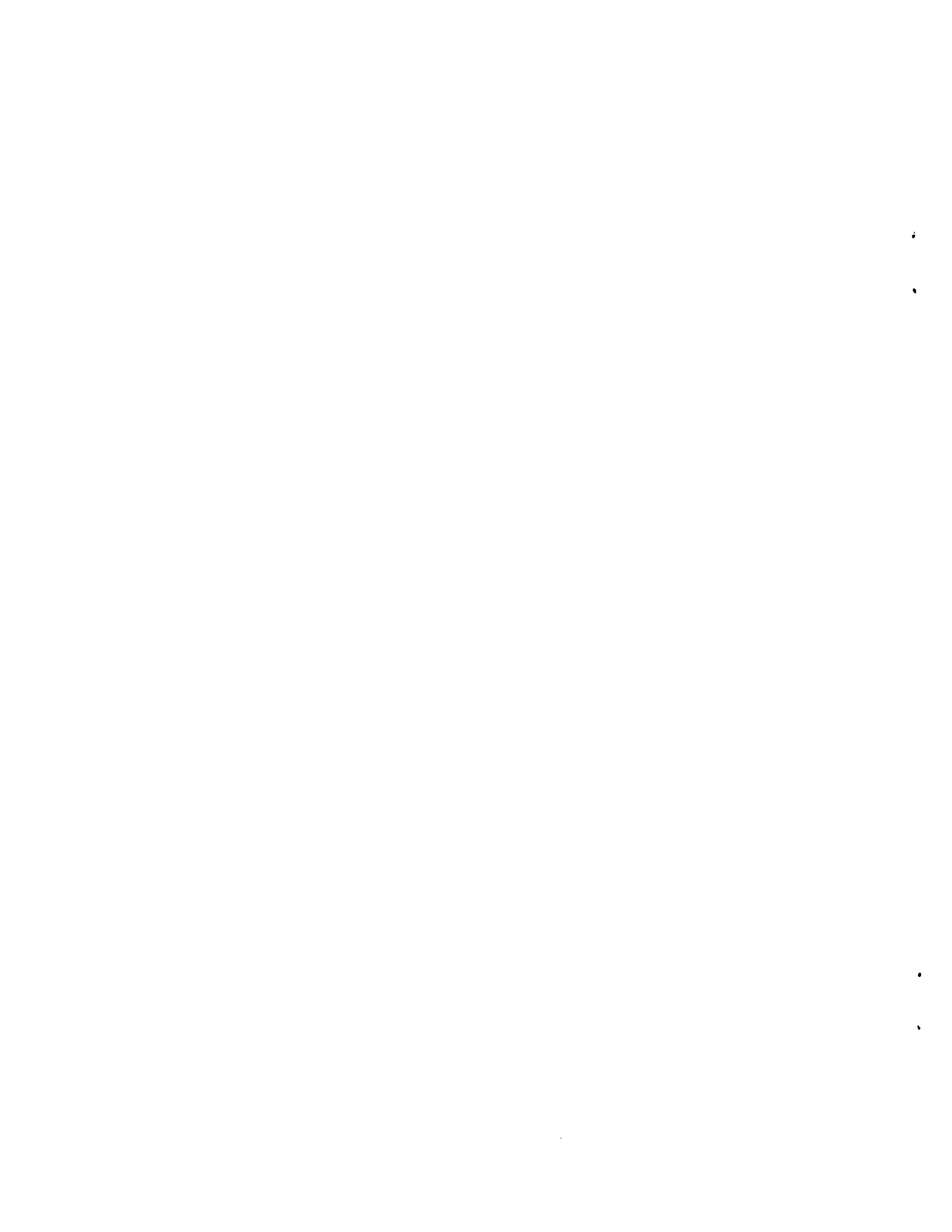
(57) Abstract: Administration of an HGF (hepatocyte growth factor) gene to a diabetic ischemic site achieves effect of promoting the angiogenesis of the ischemic site with the depression caused by diabetes and thus causing recovery from an ischemic disease.

(57) 要約:

糖尿病性虚血部位にHGF (肝実質細胞増殖因子) 遺伝子を投与することにより、糖尿病により低下した虚血部位の血管新生の促進を図り、虚血性疾患を回復させるという効果を有する。



WO 01/32220 A1



明 細 書

糖尿病性虚血性疾患遺伝子治療

5 技術分野

本発明は、肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を用いた糖尿病性虚血性疾患の治療剤及び治療法に関する。具体的には、HGF遺伝子を有効成分として含有する糖尿病性虚血性疾患治療剤やHGF遺伝子を虚血部位へ投与することを特徴とする糖尿病性虚血性疾患治療法などに関する。

10 背景技術

HGFは、成熟肝細胞に対する強力な増殖促進因子として発見され、その遺伝子クローニングがなされたタンパク質である（*Biochem Biophys Res Commun*, 122, 1450 (1984)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6489, (1986)、*FEBS*

15 *Letter*, 22, 231 (1987)、*Nature*, 342, 440 (1989)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3200 (1991))。その後の研究により、HGFは*in vivo*において肝再生因子として障害肝の修復再生に働くだけでなく、血管新生作用を有し、虚血性疾患や動脈疾患の治療または予防に大きな役割を果たしていることが明らかとなっ

20 てきた（*Symp. Soc. Exp. Biol.*, 47 cell behavior, 227-234 (1993)、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 1937-1941 (1993)、*Circulation*, 97, 381-390 (1998))。すなわち、ウサギの下肢虚血モデルにおいてHGFを投与すると、顕著な血管新生が見られ血
25 流量の改善、血圧減少の抑制、虚血症状の改善が生じたとの報告がなされている。これらの報告により、今日では、血管新生因子の一つとしてHGFが発現、機能していると考えられるようになった。

このようにHGFは血管新生因子の機能を始めとして種々の機能を持っており、医薬品として活用するための色々な試みがなされてきた。しかし、ここで問題と

なってきたのがHGFの血中での半減期である。HGFの半減期は約10分と短く、血中濃度を維持することが困難であり、また、HGF有効量の患部への移行性が問題となった。

一般的にタンパク性製剤の場合は静脈内への投与の多いことが常識となっており、前記虚血性疾患モデルに対するHGFの投与に関しても、例えば静脈や動脈内への投与の例が示されている（Circulation, 97, 381-390 (1998)）。このような動物モデルに対する静脈あるいは動脈内投与により、虚血性疾患あるいは動脈疾患に対するHGFの有効性が明らかにされているものの、具体的なHGFの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。特にHGFタンパクの場合は、前記のような半減期の問題、患部への移行性の問題もあり、HGFタンパクの有効な投与方法あるいは投与量等については、未だ結論が出されていない。

また一方で、最近の分子生物学の飛躍的向上により、遺伝子導入法による細胞機能の賦活化が可能となり、種々の取り組みがなされており、HGF遺伝子を用いて、心臓領域への遺伝子治療が試みられようとしている。遺伝子の導入法については、例えば冠動脈内拡散注入法等の幾つかの報告があるものの、虚血部位への遺伝子導入法など、特に骨格筋に対する筋肉内導入法を用いて、具体的な糖尿病性虚血性疾患に対して、効果を示した例は見出されていない。

さらに、糖尿病を併発する、または糖尿病性に惹起される虚血性疾患においては血管新生が起こりにくく、予後も不良であることが知られているが、このような糖尿病性虚血性疾患に対してHGF遺伝子の投与が有効であるか否かについては、何ら明らかにされていない。

発明の開示

本発明の目的は、HGF遺伝子を用いた糖尿病性虚血性疾患の治療剤及び治療法を提供することにある。

本発明者らは、HGF遺伝子が糖尿病性の虚血性疾患に適応できるか否かを明らかにするために鋭意検討を行った結果、当該疾患に対して、直接虚血患部にHGF遺伝子を投与することにより、極めて有効な効果が得られることを明らかにした。具体的には下肢虚血性疾患において、下肢骨格筋層にHGF遺伝子を投与

することにより、有効な効果が得られることを見出した。前述のように糖尿病を併発する、または糖尿病性に惹起される虚血性疾患においては血管新生が起こりにくく、予後も不良であることが知られている。そのため単なる虚血性疾患と異なり、糖尿病性虚血性疾患に対してHGF遺伝子が有効であるか否かはこれまで
5 明らかにされていなかったが、本発明により初めてその有効性が示された。

このようなHGF遺伝子による治療は非侵襲的な治療法であるため、病状に応じて何回でも当該遺伝子を投与することが可能であるという特徴を有する。

すなわち本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) 肝実質細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子を有効成分として含有する、糖尿
10 病性虚血性疾患治療剤、

(2) 虚血部位へ投与するための、上記 (1) の治療剤、

(3) 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経
障害又は糖尿病性心筋梗塞である、上記 (1) 又は (2) の治療剤、

(4) 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、上記 (3) の治
15 療剤、

(5) 虚血部位の筋肉内へ投与するための、上記 (1) ~ (4) のいずれかの
治療剤、

(6) HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス (HVJ) -リボソームの形態にあ
る、上記 (1) ~ (5) のいずれかの治療剤、

(7) 必要に応じて複数回投与するための、上記 (1) ~ (6) のいずれかの
20 治療剤、

(8) HGF 遺伝子として少なくとも $50 \mu\text{g}$ を用いる、上記 (1) ~ (7)
のいずれかの治療剤、

(9) HGF 遺伝子をヒトに導入することを含む、糖尿病性虚血性疾患の治療
25 法、

(10) HGF 遺伝子を虚血部位へ投与する、上記 (9) の治療法、

(11) 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神
経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、上記 (9) 又は (10) の治療法、

(12) 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、上記 (11)

の治療法、

(13) HGF 遺伝子を虚血部位の筋肉内へ投与する、上記(9)～(12)のいずれかの治療法、

5 (14) HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリボソームの形態にある、上記(9)～(13)のいずれかの治療法、

(15) HGF 遺伝子を必要に応じて複数回投与する、上記(9)～(14)のいずれかの治療法、

(16) HGF 遺伝子として少なくとも50 μ gを投与する、上記(9)～(15)のいずれかの治療法、

10 (17) 糖尿病性虚血性疾患治療剤の製造のためのHGF 遺伝子の使用、

(18) 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、上記(17)の使用、

(19) 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、上記(18)の使用、

15 (20) HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリボソームの形態にある、上記(17)～(19)のいずれかの使用、

(21) HGF 遺伝子として少なくとも50 μ gを用いる、上記(17)～(20)のいずれかの使用。

図面の簡単な説明

20 図1は、参考例1の糖尿病の下肢虚血ラット群および、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群における、血液還流比率(Perfusion ratio)の経時的变化を示したグラフである。

図2は、参考例1の糖尿病の下肢虚血ラット群および、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群における虚血筋肉内の内在性HGF濃度を示したグラフである。

25 図3は、実施例1の糖尿病の下肢虚血ラットへのHGF 遺伝子投与群および未投与群と、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群における、血液還流比率を測定した結果を示したグラフである。

図4は、実施例2の糖尿病の下肢虚血ラットへのHGF 遺伝子投与群および未

投与群と、正常ラットに下肢虚血を惹起したコントロール群における、下肢虚血部の骨格筋をALP染色し、単位当たりの血管数を比較した結果を示したグラフである。

図5は、参考例2のグルコースを添加した血管内皮細胞のHGF添加群および未添加群と、グルコースを添加していないコントロール群における、培養上清のMMP-1濃度を測定した結果を示すグラフである。

図6は、参考例3のグルコースを添加した血管内皮細胞のHGF添加群および未添加群と、グルコースを添加していないコントロール群における、血管内皮細胞中に発現する転写因子ETS-1のmRNA量を測定した結果を示すグラフである。

発明の実施するための最良の形態

本発明において使用される「HGF遺伝子」とは、HGF（HGFタンパク）を発現可能な遺伝子を指す。具体的には、Nature, 342, 440(1989)、特許第2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967(1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 321(1990)などに記載のHGFのcDNAを後述の如き適当な発現ベクター（非ウイルスベクター、ウイルスベクター）に組み込んだものが挙げられる。ここでHGFをコードするcDNAの塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、例えば肝臓や白血球由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどにより、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

さらに、本発明のHGF遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパク質がHGFと実質的に同じ作用を有する遺伝子である限り、本発明のHGF遺伝子として使用できる。すなわち、1) 前記cDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAや、2) 前記cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1若しくは複数（好ましくは数個）のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするD

NA、などのうち、HGFとしての作用を有するタンパクをコードするものであれば、本発明のHGF遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記1)及び2)のDNAは、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR法、又は通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記Molecular

- 5 Cloning等の基本書を参考にして行うことができる。

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

- 10 HGF遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与方法が詳しく解説されている（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999）。以下、具体的に説明する。

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

- 15 慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。

- 20 細胞への遺伝子導入法としては、リポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法などが挙げられる。

- また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム (internal type liposome) による遺伝子導入法、静電気型リポソーム (electrostatic type liposome) による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法 (HVJ-AVEリポソーム法)、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体 (金属粒子) とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。

このうちHVJ-リポソームは、脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス

(Hemagglutinating virus of Japan : HVJ) とを融合させたものである。当該HVJ-リボソーム法は従来のリボソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。HVJ-リボソームの調製法については文献（実験医学別冊, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社, 1996、遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社, 1997、J. Clin. Invest. 93, 1458-1464(1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220(1996)）などに詳しく述べられているため、それらを参照されたい。またHVJリボソーム法とは、例えば Molecular Medicine, 30, 1440-1448(1993)、実験医学, 12, 1822-1826(1994)、蛋白質・核酸・酵素, 42, 1806-1813(1997)等に記載の方法であり、好ましくは Circulation, 92(Suppl. II), 479-482(1995)に記載の方法が挙げられる。

なおHVJとしてはZ株（ATCCより入手可能）が好ましいが、基本的には他のHVJ株（例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など）も用いることができる。

さらに、naked-DNAの直接導入法は、上記手法のうち最も簡便な手法であり、この観点から好ましい導入法である。

15 ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えば pCAGGS (Gene 108, 193-200(1991)) や、pBK-CMV、pCDNA3.1、pZeoS V（インビトロゲン社、ストラタジーン社）などの発現ベクターが挙げられる。

20 B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス（HIV）等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、ア

デノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある

- 5 (日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、日本遺伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999)。本発明では、*in vivo* 法が好ましい。

- 10 製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態(例えば液剤など)をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含む注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤(PBS等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等)に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

- 20 本発明で用いられるHGF遺伝子以外に、血管新生作用を有する公知の因子を併用して、又は単独で用いることが可能である。例えば、VEGFやFGF等の因子は血管新生作用を有することが報告されており、これらの遺伝子を使用することが出来る。またEGF等の増殖因子は、組織の種々の細胞障害を修復することが報告されており、これらの遺伝子を用いることも可能である。

- 25 本発明でいう糖尿病性虚血性疾患とは、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害または、糖尿病性心筋梗塞などであり、これらのいずれの疾患に対しても本発明の遺伝子治療剤を適用することができる。また本発明の遺伝子治療剤は、重症の糖尿病性虚血性疾患の患者だけでなく、進行中の軽度の患者にも使用することができる。

本発明の遺伝子治療剤は、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与方法・投与部位が選択される。投与方法としては、非経口的に投与することが好ましい。また投与部位としては、虚血部位内に投与することが好ましい。ここで「虚

血部位」とは、虚血患部及びその周辺を含む部位を指す。

虚血部位においては、具体的には血管内や筋肉内などへの投与が可能であるが、特に、虚血部位の筋肉内に投与することが好ましい。すなわち下肢虚血性疾患においては、下肢虚血部位の骨格筋内に投与することにより、虚血患部の血管新生を促進させ血流量の改善を図り、虚血患部の機能の回復正常化を行うことが出来る。また心筋梗塞等の心疾患においては、心筋内に投与することにより、同様の効果を上げることができる。

好ましい投与方法としては、例えば、非侵襲的なカテーテルあるいは非侵襲的な注射器等による投与方法を挙げることができる。更に、エコー使用下での非侵襲的なカテーテルあるいは注射器等による投与方法を挙げることができる。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法としては、例えば、心疾患においては、心室内腔より心筋内に直接HGF遺伝子を注入する方法が挙げられる。

本発明のHGF遺伝子を適用することにより、糖尿病性の虚血性疾患の患者に対して積極的な遺伝子導入による治療を行うことができ、例えば、糖尿病性下肢虚血性疾患の患者においては、従来であれば外科的な患部の切除以外には道のない重症の患者に対して、機能の回復が可能となる。

本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、成人患者1人当たりHGF遺伝子として約1 μ g～約50mgの範囲、好ましくは約10 μ g～約5mg、より好ましくは約50 μ g～約5mgの範囲から投与量が選択される。

本発明の治療剤は、数日ないし数週間に一回投与するのが好適であり、投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。本発明の治療剤は、非侵襲的な投与に供されるものであるため、病状に応じて何回でも投与できるという特徴を有する。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実験材料及び方法

HVJリポソーム製剤の作製

10mgの乾燥脂質（ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、コレステロールの1:4.8:2の混合物）と、HGF遺伝子（100 μ g）－HMG1（high

- mobility group 1 nuclear protein, 25 μ g) を含有する等張液 (137 μ M NaCl, 5.4 μ M KCl, 10 μ M Tris-HCl; pH7.6) 200 μ l を混合し、激しく攪拌して超音波を掛けてリボソームを形成させた。精製センダイウイルス (Z株) を3分間UV照射 (110erg/mm²/sec) した。リボソーム懸濁液とセンダイウイルス (HV J) を混合して4°C 10分間、続いて37°C 30分間加温した。遊離のHV Jを除去して、HV Jリボソーム製剤を取得した。

実験動物

投与群：糖尿病ラット (DM-ラット) の下肢虚血ラット

コントロール・ラット：正常ラットの下肢虚血ラット

10 HV Jリボソーム製剤の投与方法

腹腔内にストレプトゾトシンを投与することにより誘発した16週齢の糖尿病ラット (1群6匹) に対して、片側大腿動脈の一部外科的切除を行って、下肢部に虚血状態を作製した。

HGF遺伝子含有HV J-リボソーム製剤を、下肢虚血骨格筋に注入した。

15 検討内容

リボソーム製剤投与後、側副血行路形成および血流改善効果の指標としてレーザー散乱光解析によるレーザー・ドップラー・イメージャー (LDI) を用いて下肢血流を測定した。正常下肢に対する虚血下肢の色調ヒストグラム (colored histogram) の平均値を血液還流比率 (perfusion ratio) とした。

- 20 下肢虚血部分の毛細血管密度をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色により測定し、糖尿病下肢虚血ラット群とコントロールの下肢虚血ラット群とで比較した。あるいは、HGF遺伝子の投与群と未投与群とで比較した。

参考例 1

糖尿病ラットの下肢虚血部位におけるHGF発現状況

- 25 腹腔内にストレプトゾトシンを投与して誘発した16週齢の糖尿病ラット (1群6匹) およびコントロール群として16週齢の正常のラット (1群6匹) に対して、片側大腿動脈の一部外科的切除を行って、下肢部に虚血状態をもたらした。

1週間後、レーザー・ドップラー・イメージャーにより虚血部位の血液還流比率を測定した。糖尿病下肢虚血ラットの下肢虚血部位の血液還流比率は、コントロー

ルの下肢虚血ラットの血液還流比率よりもはるかに低いものであった（図1参照）。

3週間後、5週間後にも、虚血部位の血液還流比率を測定したところ、同様に糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の血液還流比率は、コントロールの下肢虚血ラットの血液還流比率よりもはるかに低いものであった（図1参照）。

筋肉内の内在性HGFの濃度は、糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の筋肉内においてコントロールの下肢虚血ラットの筋肉内よりも顕著に低いものであった。この結果は、糖尿病において血管新生が不良である原因が筋肉内の内在性HGFの減少によるものであることを示している。このため、糖尿病下肢虚血ラットでは、血管新生が起こりにくくなり、側副血行路が発達しないと考えられる（図2参照）。

実施例1

糖尿病下肢虚血ラットに対するHGF遺伝子治療の効果 (I)

腹腔内にストレプトゾトシンを投与することにより誘発した16週齢の糖尿病ラット（1群6匹）および16週齢の正常ラット（1群6匹）に対して、片側大腿動脈の一部の外科的切除を行って、下肢部に虚血状態をもたらした。大腿動脈の外科的切除後、HGF遺伝子（50 μ g）含有HVJ-リボソーム製剤を下肢虚血部位の筋肉内に導入した。

3週間後、レーザー・ドップラー・イメージャーにより虚血部位の血液還流比率を測定した。HGF遺伝子が投与された糖尿病下肢虚血ラットの虚血部位の血液還流比率は、コントロールの下肢虚血ラットや未投与の上記糖尿病下肢虚血ラットと比較し、顕著な増加を示した。

コントロールの下肢虚血ラットの血液還流比率を100%とすると、HGF遺伝子未投与の糖尿病下肢虚血ラットでは67%であり、HGF遺伝子を投与した糖尿病下肢虚血ラットでは129%であった。結果を図3に示す（図1参照）。

実施例2

糖尿病下肢虚血ラットに対するHGF遺伝子治療の効果 (II)

上記と同じ様に処置をした糖尿病下肢虚血ラット、コントロールの下肢虚血ラットを作製し、HGF遺伝子治療を行った。5週間後に各ラットの下肢虚血部位

の骨格筋を取り出し、ALP染色し単位面積当たりの血管数を比較した。HGF遺伝子未投与の糖尿病下肢虚血ラットでは、コントロールの下肢虚血ラットと比較して有意に血管数が少なく、HGF遺伝子投与の糖尿病下肢虚血ラットは血管数が有意に増加していた。結果を図4に示す。

5 参考例2

血管内皮細胞によるMMP-1の産生に対するグルコース濃度およびHGF添加の影響

血管内皮細胞（ヒト大動脈由来）を無血清下で、グルコース濃度が0、25 mM、50 mMとなるような3種の培地で培養し、24時間培養後の培養液上清のMMP-1濃度を測定した。

また各々、グルコース添付の30分前にHGFを100 ng/mlで添加した場合と比較した。

上清中のMMP-1濃度が、グルコースの濃度依存的に有意に減少し、HGF処理によりMMP-1の減少が止まり増加することが示された。結果を図5に示す。

参考例3

血管内皮細胞に対するHGFの効果（血管新生に係わる転写因子ETS-1の変化）

参考例1と同様に血管内皮細胞を培養し、細胞中に発現する転写因子ETS-1のmRNA量を測定した。コントロールの内皮細胞の、ETS-1のmRNA量を100%とすると、HGF未添加の血管内皮細胞では高グルコースの条件により有意に減少していた。一方、HGF添加の血管内皮細胞ではコントロールの発現量と比較して同等以上になっていた（ $P < 0.01$ ）。結果を図6に示す。

以上のように、高グルコース条件下の血管内皮細胞では、血管新生のために必須のマトリックス分解酵素であるMMP-1の産生が減少し、血管新生時に発現、増加する転写因子であるETS-1のmRNA発現が低下していた。

上記のことから、高グルコース条件下では血管新生がおこりにくくなっていることが明らかにされた。一方、高グルコース条件下の血管内皮細胞にHGFを添加することにより、MMP-1の産生、ETS-1のmRNAの発現が顕著に増

加し、HGFにより血管新生がおこりやすくなっていることが示された。

産業上の利用可能性

本発明のHGF遺伝子を有効成分とする糖尿病性虚血性疾患治療剤は、HGFの発現の減少した糖尿病性虚血患部に特有の血管新生不良を改善し、顕著な血管新生作用を示すことから、虚血患部の血流量を増大させ病状を改善することができる。しかも、本発明の治療剤は患者の病状に応じて1回以上の投与を行うことにより、その目的である血管新生を促進することができる。従ってこれらの効果により、本発明の治療剤は糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害または、糖尿病性心筋梗塞をよりの確に治療することができる。

請求の範囲

1. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を有効成分として含有する、糖尿病性虚血性疾患治療剤。
- 5 2. 虚血部位へ投与するための、請求項1記載の治療剤。
3. 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、請求項1又は2記載の治療剤。
4. 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、請求項3記載の治療剤。
- 10 5. 虚血部位の筋肉内へ投与するための、請求項1～4のいずれか記載の治療剤。
6. HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリポソームの形態にある、請求項1～5のいずれか記載の治療剤。
7. 必要に応じて複数回投与するための、請求項1～6のいずれか記載の治療
- 15 剤。
8. HGF遺伝子として少なくとも50 μ gを用いる、請求項1～7のいずれか記載の治療剤。
9. HGF遺伝子をヒトに導入することを含む、糖尿病性虚血性疾患の治療法。
10. HGF遺伝子を虚血部位へ投与する、請求項9記載の治療法。
- 20 11. 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経障害又は糖尿病性心筋梗塞である、請求項9又は10記載の治療法。
12. 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、請求項11記載の治療法。
13. HGF遺伝子を虚血部位の筋肉内へ投与する、請求項9～12のいずれ
- 25 か記載の治療法。
14. HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリポソームの形態にある、請求項9～13のいずれか記載の治療法。
15. HGF遺伝子を必要に応じて複数回投与する、請求項9～14のいずれか記載の治療法。

16. HGF 遺伝子として少なくとも 50 μ g を投与する、請求項 9～15 のいずれか記載の治療法。
17. 糖尿病性虚血性疾患治療剤の製造のための HGF 遺伝子の使用。
18. 糖尿病性虚血性疾患が、糖尿病性下肢虚血性疾患、糖尿病性虚血性神経
- 5 障害又は糖尿病性心筋梗塞である、請求項 17 記載の使用。
19. 糖尿病性虚血性疾患が糖尿病性下肢虚血性疾患である、請求項 18 記載の使用。
20. HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス (HVJ) -リポソームの形態にある、請求項 17～19 のいずれか記載の使用。
- 10 21. HGF 遺伝子として少なくとも 50 μ g を用いる、請求項 17～20 のいずれか記載の使用。

FIG. 1

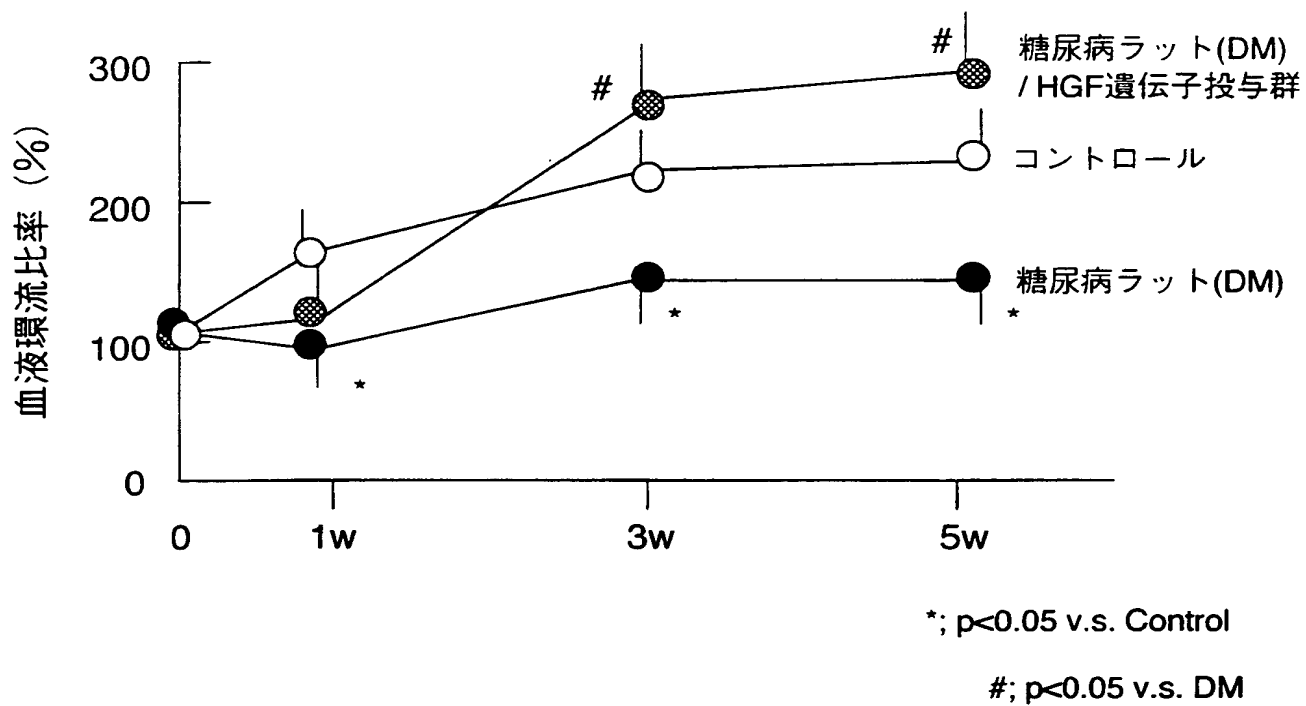


FIG. 2

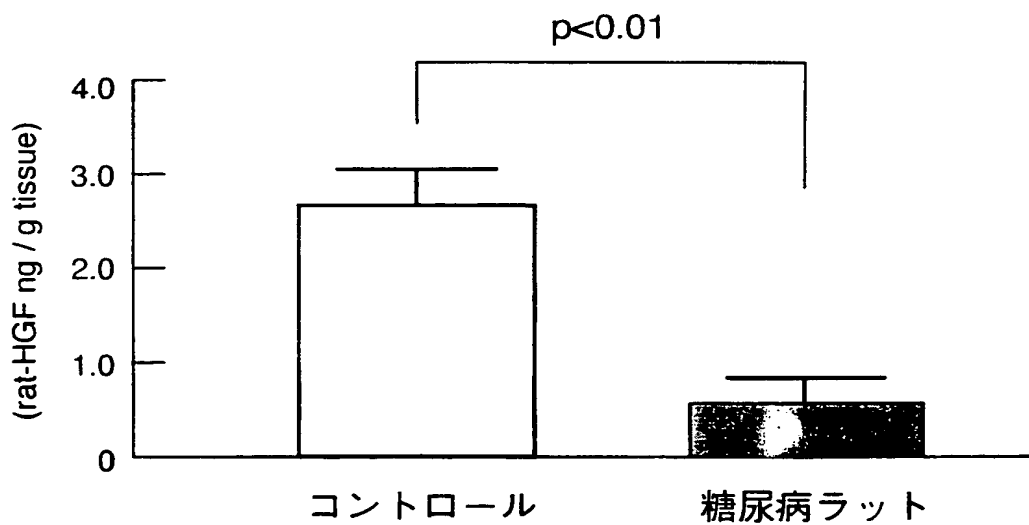


FIG. 3

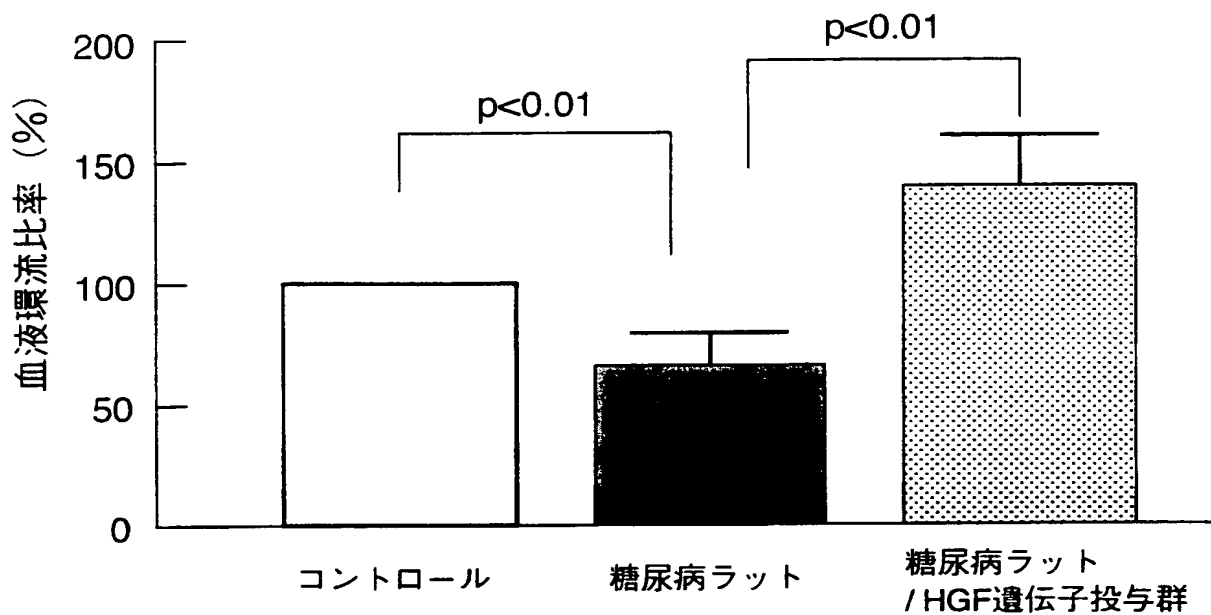
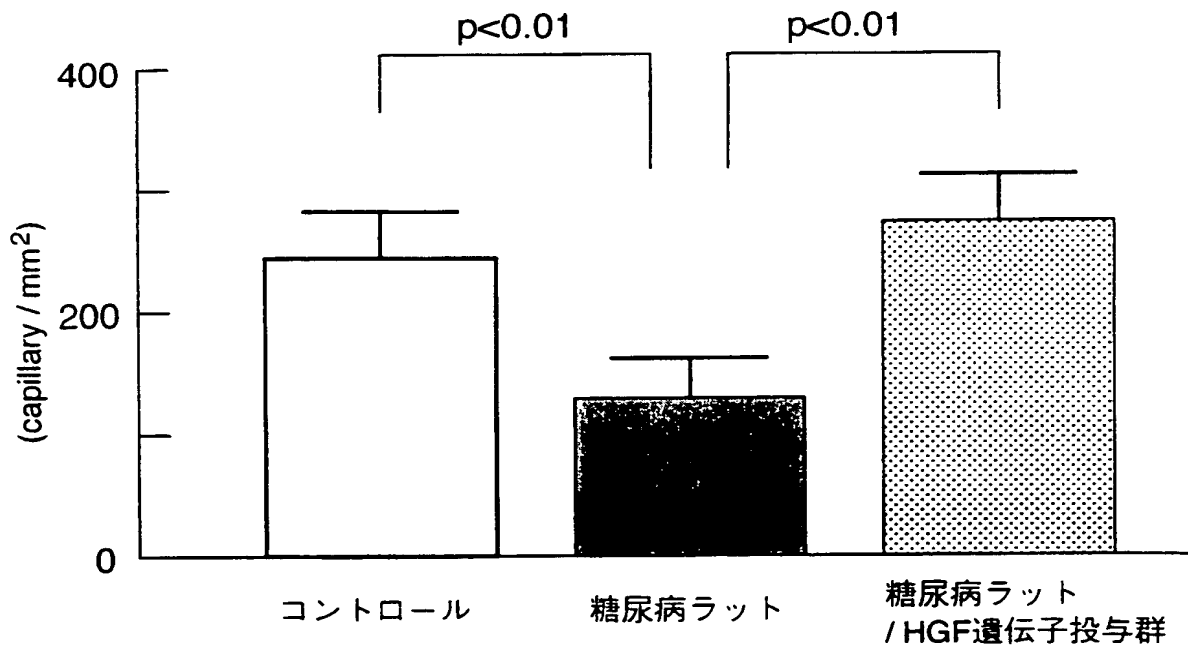
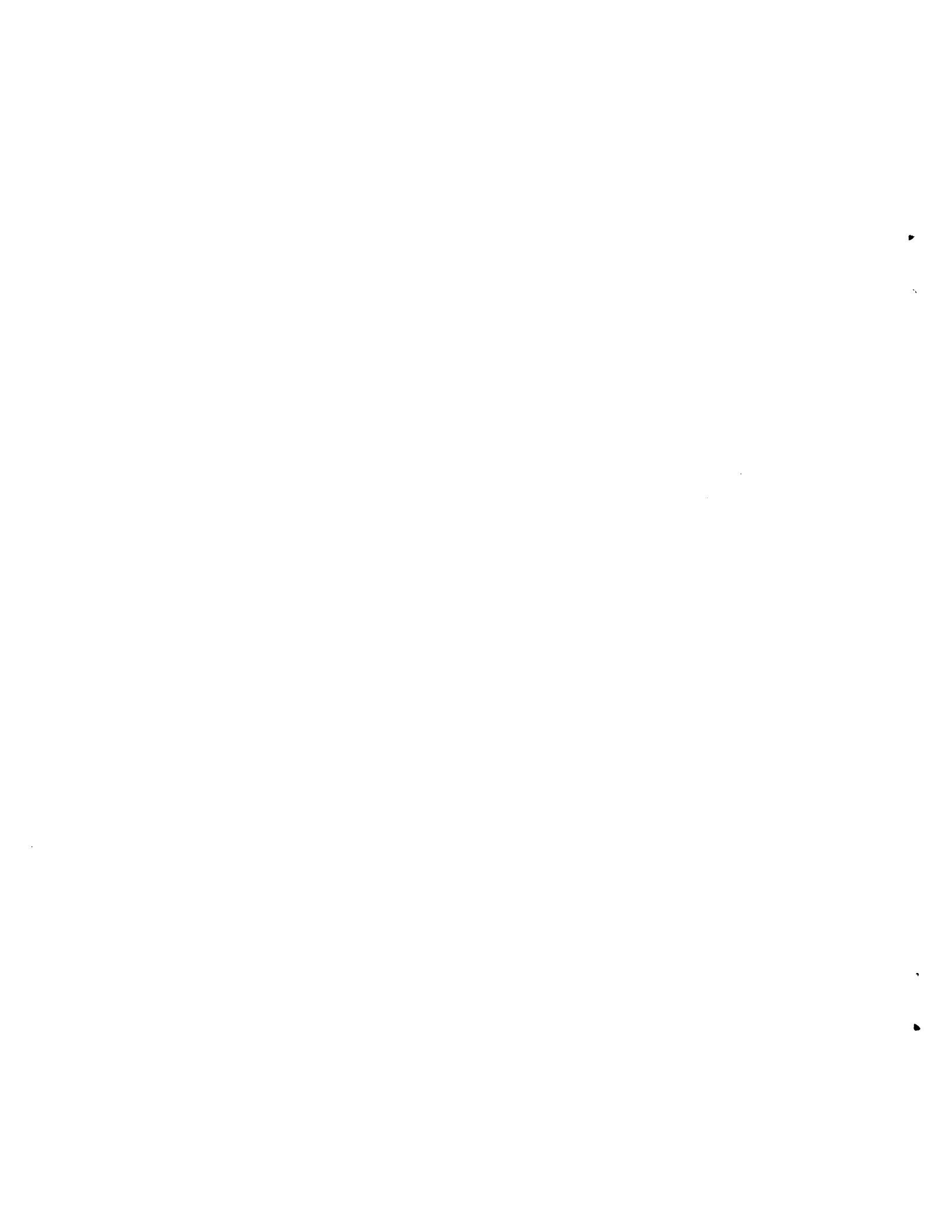


FIG. 4





3/3
FIG. 5

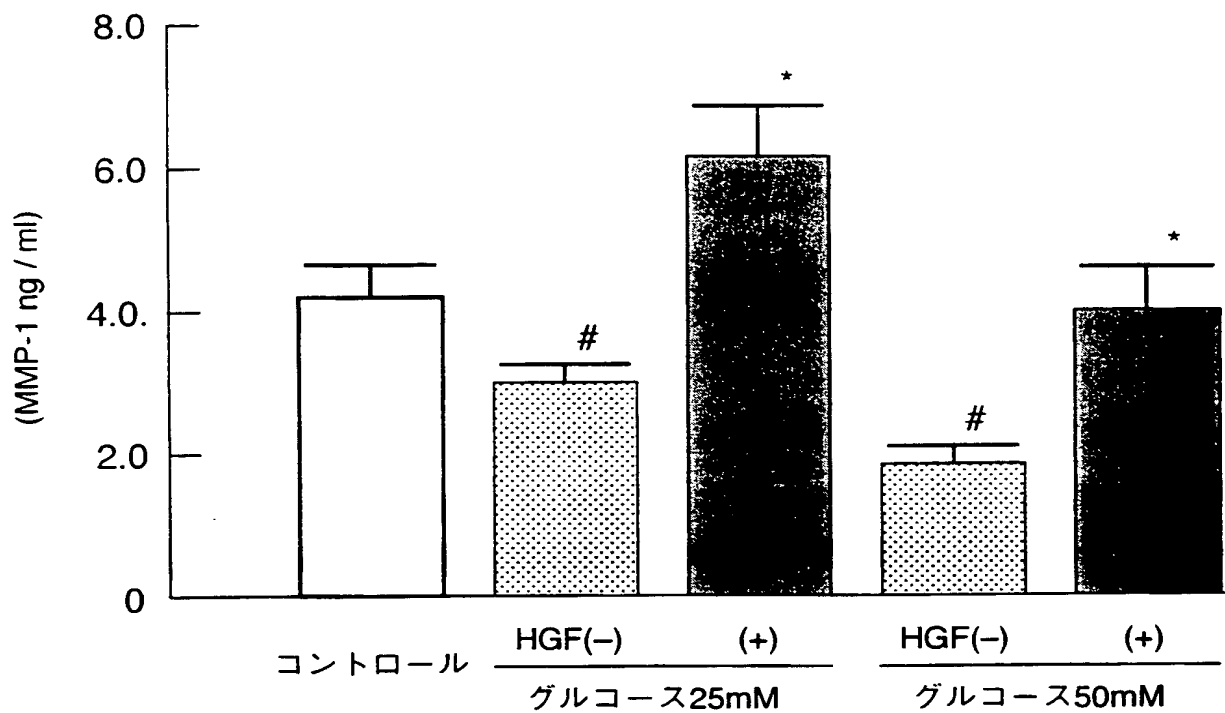
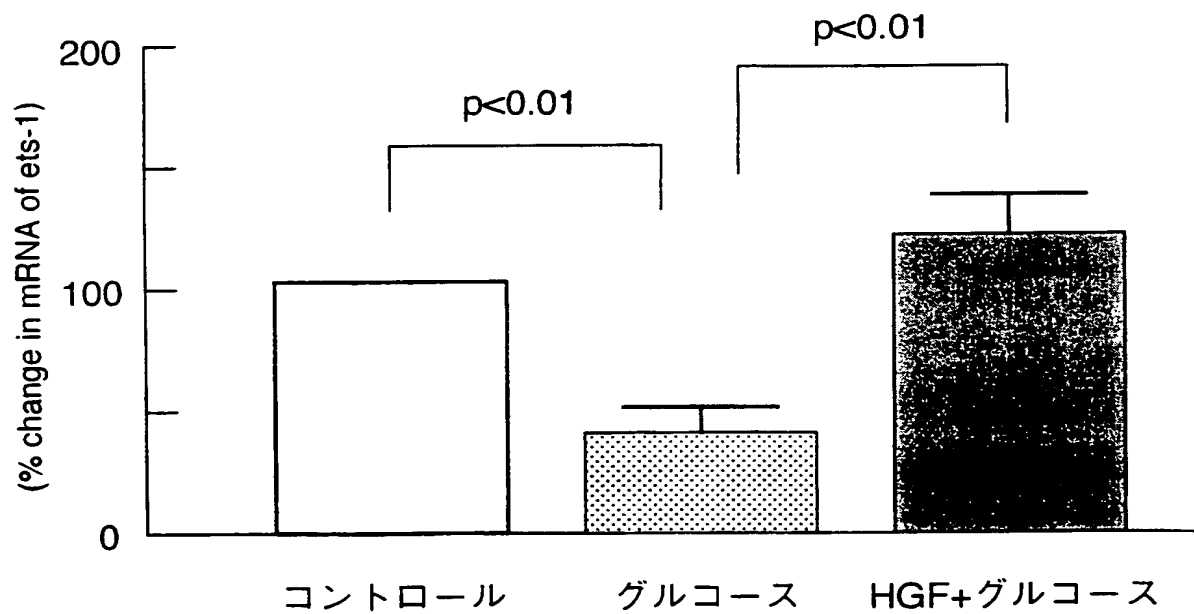


FIG. 6





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP00/07502
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 MEDLINE (STN) , BIOSIS (STN) , CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol.97, pp.381-390	1-8,17-21
X	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol.90, pp.1937-1941	1-8,17-21
X	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, pp.1321	1-8,17-21
X	UEDA, Hideki et al., "In vivo gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart: Evidence for a role of HGF in endogenous myocardial protection", Circulation, (1997) Vol. 96, No. 8, p. 1619	1-8,17-21

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search 22 December, 2000 (22.12.00)	Date of mailing of the international search report 16 January, 2001 (16.01.01)
---	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07502

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/14307, A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.), 24 April, 1997 (24.04.97) & JP, 11-514366, A & US, 6121246, A & EP, 883343, A1 & AU, 9674548, A	1-8, 17-21
X	WO, 99/36103, A1 (MCGILL UNIVERSITY), 22 July, 1999 (22.07.99) (Family: none)	1-3, 5-8, 17, 18, 20, 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07502

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 to 16 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 9/127, A61P9/10, 3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol. 97, p. 381-390	1-8, 17-21
X	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol. 90, p. 1937-1941	1-8, 17-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 22.12.00

国際調査報告の発送日 16.01.01

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
榎本 佳子 印 4P 9638
電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, p. I321	1-8, 17-21
X	UEDA, Hideki et al., "In vivo gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart: Evidence for a role of HGF in endogenous myocardial protection", Circulation, (1997) Vol. 96, No. 8, p. I619	1-8, 17-21
X	WO, 97/14307, A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.) 24. 4月. 1997 (24. 04. 97) &JP, 11-514366, A &US, 6121246, A &EP, 883343, A1 &AU, 9674548, A	1-8, 17-21
X	WO, 99/36103, A1 (MCGILL UNIVERSITY) 22. 7月. 1999 (22. 07. 99) (ファミリーなし)	1-3, 5-8, 17, 18, 20, 21

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 9-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲9-16は手術又は治療による人体の手術又は治療による処置方法及び診断方法であり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

1

2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, p. I321	1-8, 17-21
X	UEDA, Hideki et al., "In vivo gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates ischemia-reperfusion injury in the heart: Evidence for a role of HGF in endogenous myocardial protection", Circulation, (1997) Vol. 96, No. 8, p. I619	1-8, 17-21
X	WO, 97/14307, A1 (ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.) 24. 4月. 1997 (24. 04. 97) &JP, 11-514366, A &US, 6121246, A &EP, 883343, A1 &AU, 9674548, A	1-8, 17-21
X	WO, 99/36103, A1 (MCGILL UNIVERSITY) 22. 7月. 1999 (22. 07. 99) (ファミリーなし)	1-3, 5-8, 17, 18, 20, 21

EP · **US** PCT
 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
 [PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 E5576-00	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/07502	国際出願日 (日.月.年) 26.10.00	優先日 (日.月.年) 29.10.99
出願人(氏名又は名称) メドジーン バイオサイエンス株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 9-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲9-16は手術又は治療による人体の手術又は治療による処置方法及び診断方法であり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K48/00, 37/24, 9/127, A61P9/10, 3/10

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K48/00, 37/24, 9/127, A61P9/10, 3/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol. 97, p. 381-390	1-8, 17-21
X	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol. 90, p. 1937-1941	1-8, 17-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 22. 12. 00
 国際調査報告の発送日 1. 01. 01

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 榎本 佳子 印	4 P	9638
	電話番号 03-3581-1101	内線	3492

